

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

DIPEPTIDISCHE BENZAMIDINE ALS KININOGENASEN-INHIBITOREN

Beschreibung

5

- Die vorliegende Erfindung betrifft neue Benzamidine, ihre Herstellung und ihre Verwendung als kompetitive Inhibitoren von Trypsin-ähnlichen Serinproteasen, besonders Thrombin und Kininogenasen wie Kallikrein. Die Erfindung bezieht sich auch
- 10 auf pharmazeutische Zusammensetzungen, die die Verbindungen als aktive Bestandteile enthalten, sowie die Verwendung der Verbindungen als Thrombininhibitoren, Antikoagulantien und als antiinflammatorische Agenzien.
- 15 Thrombin gehört zur Gruppe der Serinproteasen und spielt als terminales Enzym in der Blutgerinnungskaskade eine zentrale Rolle. Sowohl die intrinsische als auch die extrinsische Gerinnungskaskade führen über mehrere Verstärkungsstufen zur Entstehung von Thrombin aus Prothrombin. Die thrombinkatalysierte
- 20 Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin leitet dann die Blutgerinnung und die Aggregation der Thrombozyten ein, die ihrerseits durch die Bindung von Plättchenfaktor 3 und Gerinnungsfaktor XIII sowie eine ganze Reihe von hochaktiven Mediatoren die Thrombinbildung verstärken.
- 25 Thrombinbildung und -wirkung sind zentrale Ereignisse bei der Entstehung sowohl von weißen, arteriellen als auch von roten, venösen Thromben und daher potentiell wirksame Angriffspunkte für Pharmaka. Thrombininhibitoren sind im Gegensatz zu Heparin in der
- 30 Lage, unabhängig von Kofaktoren gleichzeitig die Wirkungen von freiem Thrombin als auch an Thrombozyten gebundenes vollständig zu hemmen. Sie können in der Akutphase thromboembolische Ereignisse nach perkutaner transluminaler koronarer Angioplastie (PTCA) und Lyse verhindern und als Antikoagulantien in der
- 35 extrakorporalen Zirkulation (Herz-Lungen-Maschine, Hämodialyse) dienen. Sie können auch allgemein zur Thromboseprophylaxe, beispielsweise nach chirurgischen Eingriffen dienen.

- Es ist bekannt, daß synthetische Argininderivate die Enzym-
- 40 aktivität des Thrombins beeinflussen, indem sie mit dem aktiven Serinrest der Protease Thrombin in Wechselwirkung treten. Peptide auf der Basis Phe-Pro-Arg, in denen die N-terminale Aminosäure in der D-Form vorliegt, haben sich als besonders günstig erwiesen. D-Phe-Pro-Arg-isopropylester ist als kompetitiv wirkender
- 45 Thrombininhibitor beschrieben (C.Mattson u.a., Folia Haematol, 109, 43 bis 51, 1983).

Die Derivatisierung des C-Terminus Arginin zum Aldehyd führt zu einer Verstärkung der Inhibitorwirkung. So sind eine Vielzahl von Arginalen beschrieben, die die Hydroxylgruppe des "aktiven" Serins halbacetalisch zu binden vermögen (EP 185390, 479489, 5 526877, 542525; WO 93/15756, 93/18060).

Die thrombininhibitorische Wirksamkeit peptidischer Ketone, fluorierte Alkylketone, sowie von Ketoestern, Borsäurederivaten, Phosphorsäureestern und α -Ketocarbonsäureamiden ist ebenfalls mit 10 dieser Serin-Wechselwirkung erklärbar (EP 118280, 195212, 362002, 364344, 410411, 471651, 589741, 293881, 503203, 504064, 530167; WO 92/07869, 94/08941).

Bei den von J. Oleksyszyn u.a. in J. Med. Chem. 37, 226 bis 231 15 (1994) beschriebenen peptidischen 4-Amidinophenyl-glycinphosphonat-diphenylestern handelt es sich um irreversible Thrombininhibitoren mit unzureichender Selektivität gegenüber anderen Serinproteasen.

20 In DE 3 108 810, WO 93/11152 und EP 601 459 sind Agmatin und damit Arginin-Derivate beschrieben, die keine Wechselwirkung mit dem aktiven Serin der Serinproteasen eingehen können.

WO 94/29336, EP 0 601 459 und WO 95/23609 stellen eine Weiter- 25 entwicklung dar, wobei der Agmatin durch einen Arylamidinrest ersetzt ist.

Kininogenasen sind Serinproteasen, die aus Kininogenen vasoaktive Peptide, die sog. Kinine (Bradykinin, Kallidin und Met-Lys- 30 bradylinin), freisetzen. Kininogene stellen multifunktionale Proteine dar, die in Kaskadenreaktionen der Gerinnung und Entzündung auftreten. Als Inhibitoren schützen sie Zellen vor der Zerstörung durch Cystein-Proteasen (Müller Esterl, 1985, FEBS Lett. 182, 310-314).

35 Wichtige Kininogenasen sind Plasma-Kallikrein, Gewebs-Kallikrein und Mastzellen-Tryptase.

Kinine wie Bradykinin und Kallidin sind vasoaktive Peptide, die 40 eine Vielzahl biologischer Prozesse beeinflussen. Sie spielen in entzündlichen Prozessen eine wesentliche Rolle. Durch Erhöhung der vaskulären Permeabilität führen sie zu Hypotension und Ödemen. Weiterhin sind sie sehr potente schmerzproduzierende Autacoide und haben als zelluläre Mediatoren in der Pathophy- 45 logie des Asthmas, der allergischen Rhinitis und der Arthritis

große Bedeutung (K.D. Bhoola, C.D. Figueroa, K. Worthy, Pharmacological Reviews 1992, 44 (1), 1-80).

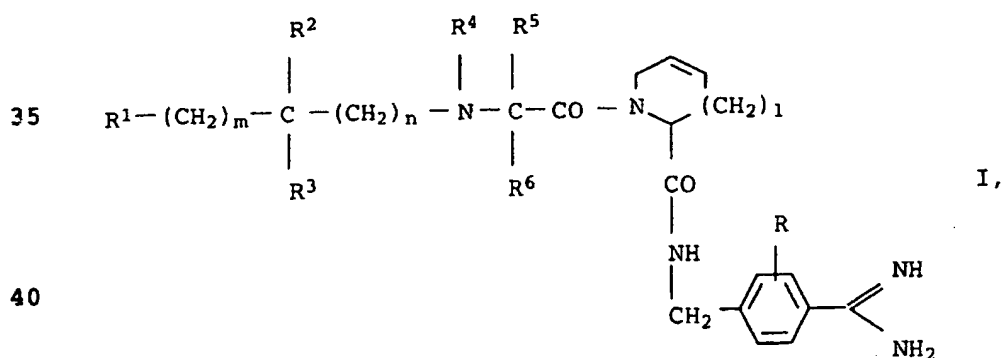
Unabhängig von den Mechanismen, die entzündlichen Prozessen zugrundeliegen, kommt es zum Austritt von Flüssigkeit aus den Blutgefäßen, die alle Protein-Systeme des zirkulierenden Blutes enthält. Das bedeutet, daß der Austritt von Plasmaflüssigkeit aus den Gefäßen in Krankheiten wie Asthma, Rhinitis und entzündungsbedingten inneren Krankheiten eine Rolle spielt. Besonders in allergischen Prozessen wird dabei Mastzell-Tryptase freigesetzt (Salomonsson et al., Am. Rev. Respir. Dis., 1992, 146, 1535-1542).

Die Arginin-Chloromethylketone H-(D)-Pro-Phe-Arg-CH₂Cl und H-(D)-Phe-Phe-Arg-CH₂-Cl wurden von Kettner und Shaw als Plasmakallikreininhibitoren beschrieben (Biochem. 1978, 17, 4778-4784 und Meth. Enzym. 1981, 80, 826-842).

Verschiedene synthetische Derivate von Benzamidinen und Benzylaminen erwiesen sich als Inhibitoren von Plasmakallikrein, wobei die Benzamidine eine wesentlich stärkere inhibitorische Wirkung aufweisen (F. Markward, S. Drawert, P. Walsmann, Biochemical Pharmacology 1974, 23, 2247-2256).

Auch PKSI-527, das Hydrochlorid von N-(trans-4-aminomethylcyclohexylcarbonyl)-L-phenylalanin-4-carboxymethyl-anilid, ist ein wirksamer Inhibitor für diese Kininogenase (Wanaka, Ohamoto et al., Thromb. Res. 1990, 57 (6), 889-895).

Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen der Formel I



worin die Reste R, R¹, R², R³, R⁴, R⁵ und R⁶ sowie l, m und n folgende Bedeutungen besitzen:

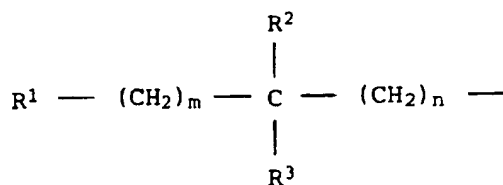
- 1 0 oder 1,
 m 0,1 oder 2,
 n 0,1 oder 2,
 R H oder C₁₋₄-Alkyl-,
 5 R¹ HOOC-, C₁₋₆-Alkyl-OOC-, Benzyl-OOC- oder -OH,
 R² H-, C₁₋₄-Alkyl- oder R¹-(CH₂)_m-,
 R³ H- oder C₁₋₄-Alkyl-, welches durch -OH oder -COOH
 substituiert sein kann,
 R⁴ H-, C₁₋₄-Alkyl-, HOOC-C₁₋₄-alkylen-,
 10 R⁵ C₁₋₈-Alkyl-, Cycloalkyl-(CR⁸R⁹)_r-, (r = 0 oder 1, R⁸,
 R⁹ = H-, Cycloalkyl- oder C₁₋₄-Alkyl-), worin bis
 zu vier CH₂-Gruppen des Cycloalkylrestes unabhängig
 voneinander durch CR¹⁰R¹¹ (R¹⁰ = H- oder C₁₋₄-Alkyl-,
 R¹¹ = C₁₋₄-Alkyl-) und/oder die an CR⁸R⁹ gebundene
 15 CH-Gruppe des Cycloalkylrestes durch CR¹²
 (R¹² = C₁₋₄-Alkyl-) ersetzt sein können und/oder eine
 oder zwei C-C-Einfachbindung(en) im Ring durch eine
 C=C-Doppelbindung ersetzt sein können,
 R⁶ H-, C₁₋₄-Alkyl- oder
 20 R⁴ und R⁵ zusammen -CH₂-CH₂-CH(R⁷)-, (R⁷ = H-, Phenyl- oder
 Cyclohexyl-)
 R² und R⁵ zusammen -CH₂-CH₂- oder -CH₂-CH₂-CH₂-, worin ein Wasser-
 25 stoffatom durch C₁₋₄-Alkyl-, Phenyl- oder Cycloalkyl-
 ersetzt sein kann,

sowie deren Salze mit physiologisch verträglichen Säuren.

- 30 Die durch -NR⁴-C(R⁵R⁶)-CO-dargestellten Aminosäurereste sind
 vorzugsweise (D)-konfiguriert, das 3,4-Dehydroprolin bzw. die
 4,5-Dehydropipecolinsäure vorzugsweise (L)-konfiguriert.

Bevorzugt sind Verbindungen der Formel I, worin die Gruppe

35

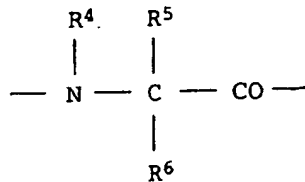


40

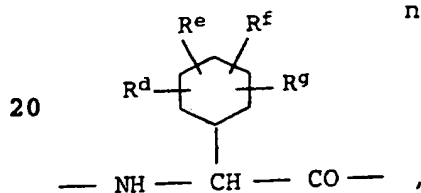
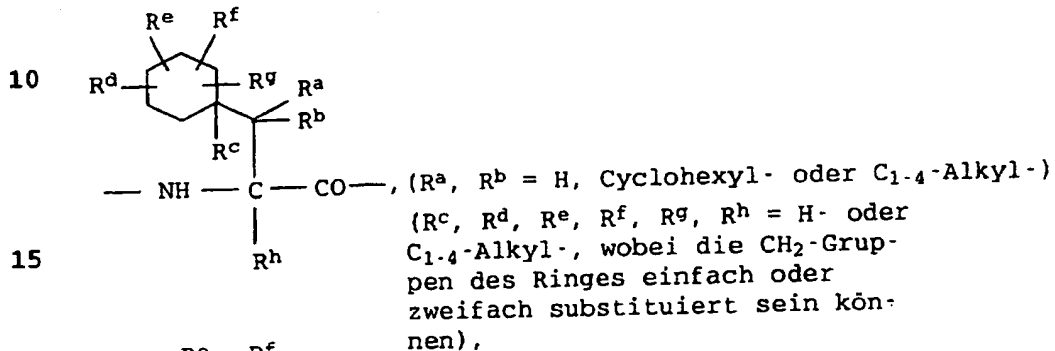
- HOOC-(CH₂)_t- (t = 1, 2 oder 3), (HOOC-CH₂)₂-CH-, (HO-CH₂)₂-CH-,
 HOOC-CH₂-CH(COOH)-, HOOC-CH(CH₂-CH₂-OH)-, HOOC-CH(C₁₋₄-Alkyl)-,
 45 C₁₋₄-Alkyl-OOC-CH₂-, Benzyl-OOC-CH₂- ist,

5

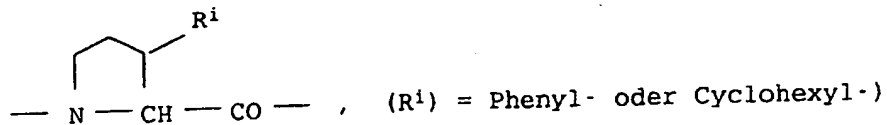
und worin die Gruppe



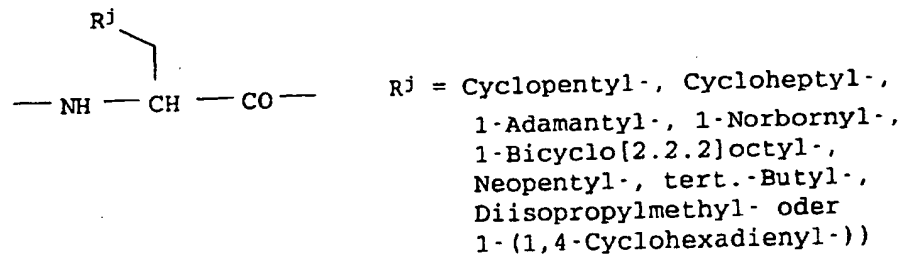
5



25



30



35

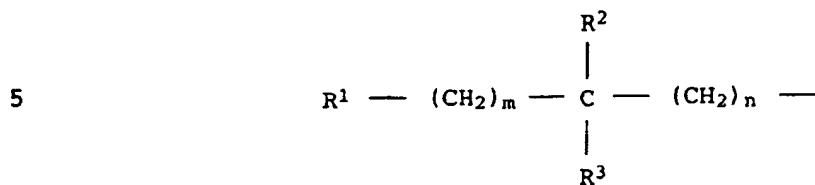
40 bedeutet, wobei dieser Baustein vorzugsweise D-konfiguriert ist,

1 0 ist und

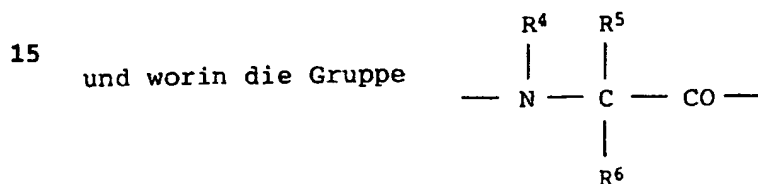
R H- oder CH₃- ist.

45

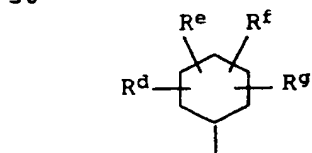
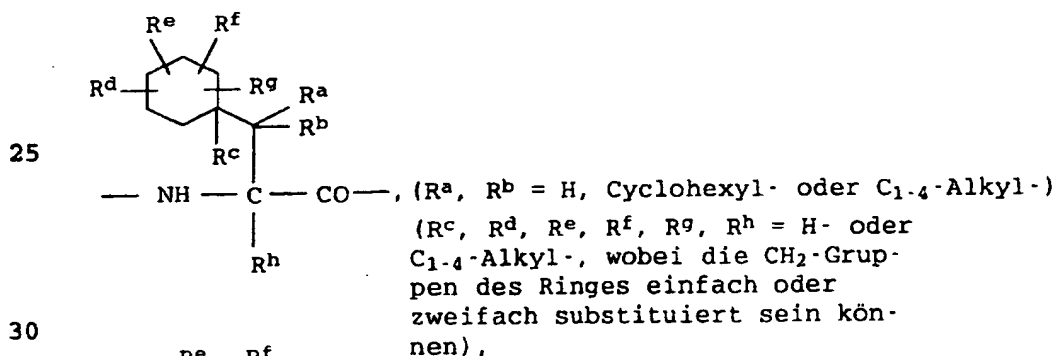
Bevorzugt sind weiter Verbindungen der Formel I, worin die Gruppe

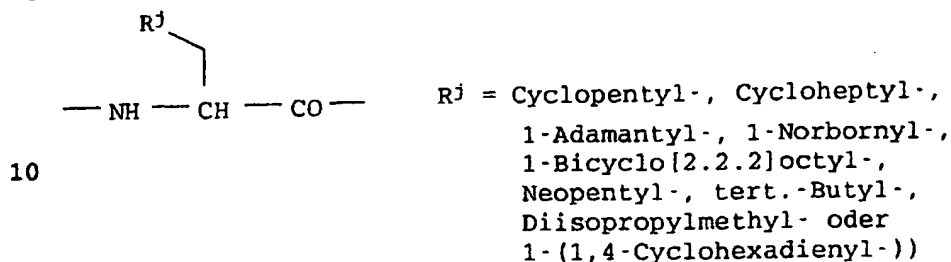
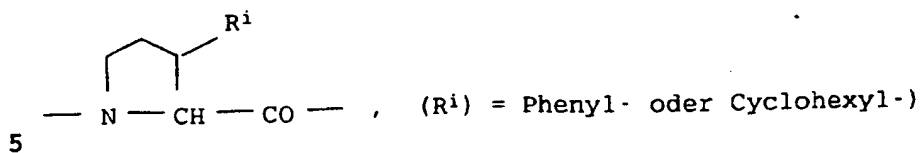


10 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_t-$ ($t = 1, 2$ oder 3), $(\text{HOOC}-\text{CH}_2)_2-\text{CH}-$, $(\text{HO}-\text{CH}_2)_2\text{CH}-$,
 $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COOH})-$, $\text{HOOC}-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH})-$, $\text{HOOC}-\text{CH}(\text{C}_{1-4}\text{-Alkyl})-$,
 $\text{C}_{1-4}\text{-Alkyl}-\text{OOC}-\text{CH}_2-$, $\text{Benzyl}-\text{OOC}-\text{CH}_2-$ ist,



20

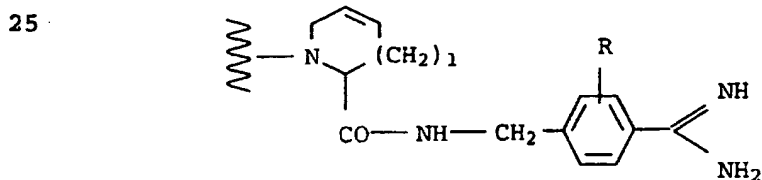




15 bedeutet, wobei dieser Baustein vorzugsweise D-konfiguriert ist,

1 1 ist und
R H- oder CH₃-ist.

20 Bevorzugt sind auch Verbindungen mit dem strukturellen Element
der Formel



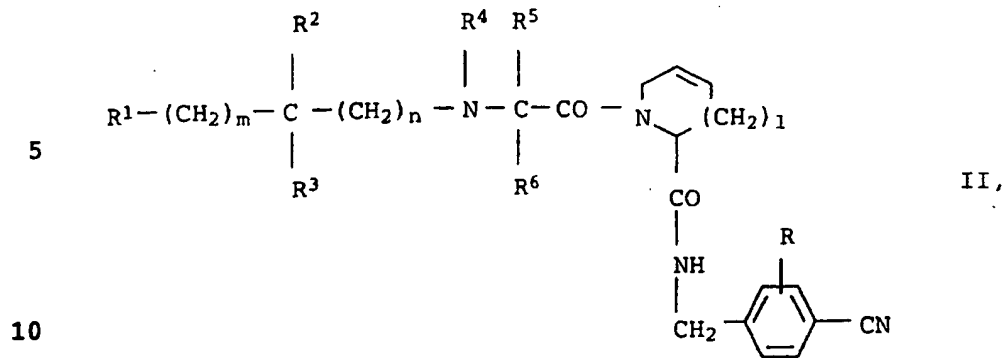
30

worin 1 = 0 oder 1 und R = H oder C₁-C₄-Alkyl, insbesondere CH₃,
bedeutet.

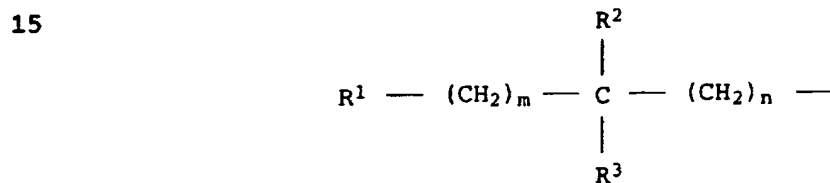
35 Als Zwischenverbindungen sind Verbindungen der Formel II bevor-
zugt

40

45



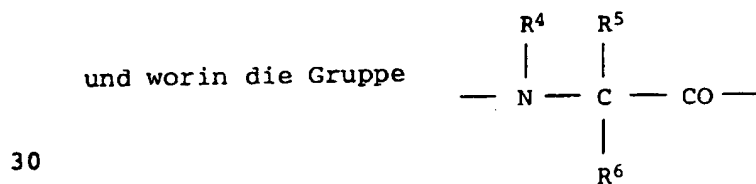
worin die Gruppe

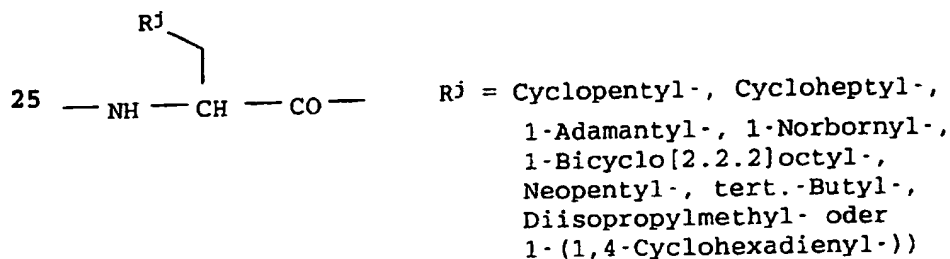
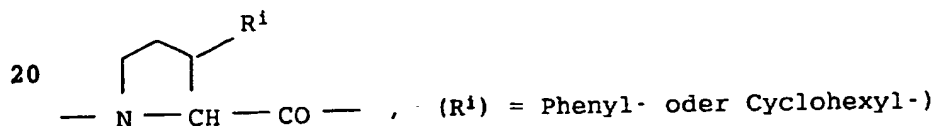
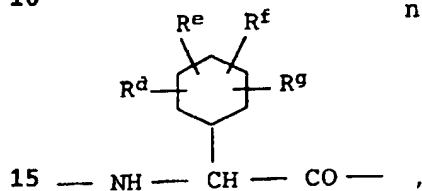
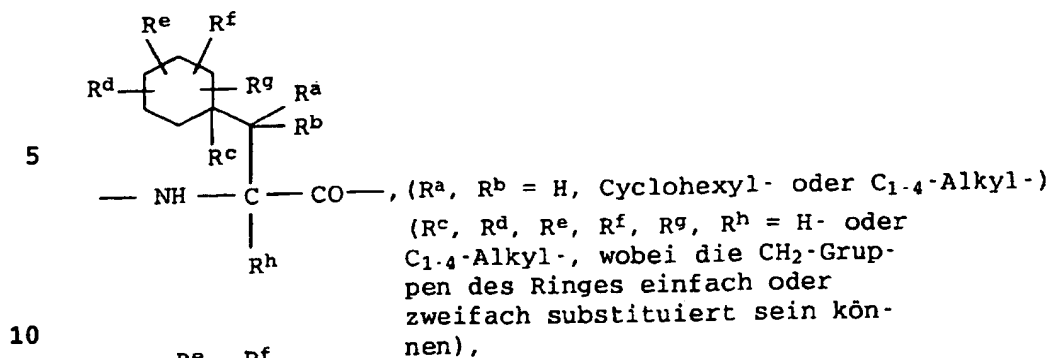


HOOC-(CH₂)_t- (t = 1, 2 oder 3), (HOOC-CH₂)₂-CH-, (HO-CH₂)₂CH-,
 HOOC-CH₂-CH(COOH)-, HOOC-CH(CH₂-CH₂-OH)-, HOOC-CH(C₁₋₄-Alkyl)-,
 C₁₋₄-Alkyl-OOC-CH₂-, Benzyl-OOC-CH₂- ist,

25

und worin die Gruppe





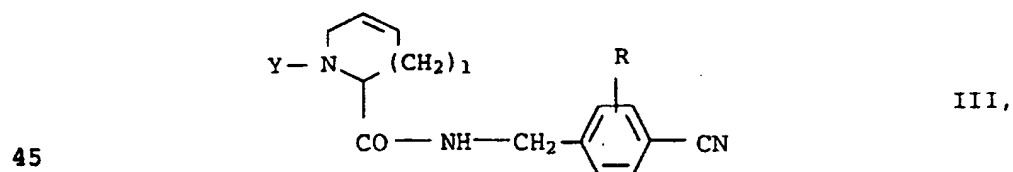
bedeutet, wobei dieser Baustein vorzugsweise D-konfiguriert ist,

35 1 0 oder 1 ist und

R H- oder CH₃- ist.

Weiterhin sind als Zwischenstufen die Verbindungen der Formel

40



interessant, worin 1 und R die Bedeutung gemäß Anspruch 1 besitzt und Y eine N-Schutzgruppe, eine N-terminal geschützte oder ungeschützte Aminosäure oder H- bedeutet.

5 Bevorzugte Verbindungen der Formel III sind diejenigen, in denen

Y Boc-, Boc-Cha-, H-Cha-, Boc-Chg-, H-Chg oder H,

1 = 0 oder 1 und R = H oder CH₃ bedeuten.

10

Folgende Substanzen sind besonders bevorzugt:

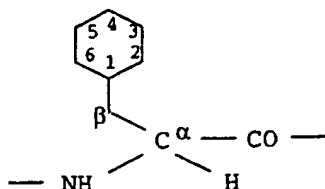
1. HOOC-CH₂-(D)-Cha-Pyr-NH-4-amb
2. HOOC-(CH₂)₂-(D)-Cha-Pyr-NH-4-amb
- 15 3. (HOOC-CH₂)₂CH-(D)-Cha-Pyr-NH-4-amb
4. (HO-CH₂)₂CH-(D)-Cha-Pyr-NH-4-amb
5. HOOC-CH₂-CH(COOH)-(D)-Cha-Pyr-NH-4-amb
6. HOOC-CH₂-(D)-Chg-Pyr-NH-4-amb
7. HOOC-CH₂-(D)-(α-Me)Cha-Pyr-NH-4-amb
- 20 8. HOOC-CH₂-(D,L)-(1-Me)Cha-Pyr-NH-4-amb
9. HOOC-CH₂-(D,L)-(β,β-Me₂)Cha-Pyr-NH-4-amb
10. HOOC-CH₂-(D,L)-(trans 4-Me)Cha-Pyr-NH-4-amb
11. HOOC-CH₂-(D,L)-Cycloheptylalanin-Pyr-NH-4-amb
12. HOOC-CH₂-(D,L)-1-Adamantylalanin-Pyr-NH-4-amb
- 25 13. HOOC-CH₂-(D,L)-2-Norbornylglycin-Pyr-NH-4-amb
14. HOOC-CH₂-(D,L)-(3,3-Me₂)Cha-Pyr-NH-4-amb
15. HOOC-CH₂-(D)-tert.-Butylalanin-Pyr-NH-4-amb
16. HOOC-CH₂-(D,L)(1,4-Cyclohexadien-1-yl)alanin-Pyr-NH-4-amb
17. HOOC-CH₂-(D)-Cha-Dep-NH-4-amb
- 30 18. HOOC-CH₂-(D)-Chg-Dep-NH-4-amb
19. HOOC-CH₂-(D,L)-Dch-Pyr-NH-4-amb

Hier wie auch in den Beispielen werden folgende Abkürzungen verwendet:

35

- amb = amidinobenzyl
 Boc = tert.-Butyloxycarbonyl
 Cha = Cyclohexylalanin
 Chea = Cycloheptylalanin
 40 Chg = Cyclohexylglycin
 Dch = Dicyclohexylalanin
 Dpa = Diphenylalanin
 Me = Methyl
 Pyr = 3,4-Dehydroprolin
 45 Dep = 4,5-Dehydropipecolinsäure

Für den Fall, daß $-NR^4-CR^5R^6-CO-$ ein Cyclohexylalanin-Rest ist, wurden die einzelnen C-Atome wie folgt bezeichnet:



Die Verbindungen der Formel I können als solche oder in Form ihrer Salze mit physiologisch verträglichen Säuren vorliegen. Beispiele für solche Säuren sind: Salzsäure, Zitronensäure, Weinsäure, Milchsäure, Phosphorsäure, Methansulfonsäure, Essigsäure, Ameisensäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Bernsteinsäure, Hydroxybernsteinsäure, Schwefelsäure, Glutarsäure, Asparaginsäure, Brenztraubensäure, Benzoesäure, Glucuronsäure, Oxalsäure, Ascorbinsäure und Acetylglycin.

Die neuen Verbindungen der Formel I lassen sich bei folgenden Indikationen einsetzen:

- Krankheiten, deren Pathomechanismus direkt oder indirekt auf der proteolytischen Wirkung von Thrombin beruht,
- Krankheiten, deren Pathomechanismus auf der thrombinabhängigen Aktivierung von Rezeptoren und Signaltransduktionen beruht,
- Krankheiten, die mit Stimulation [z.B. durch PAI-1, PDGF (platelet derived growth factor), P-Selectin, ICAM-1, Tissue Factor] oder Inhibition (z.B. NO-Synthese in Glattmuskelzellen) von Genexpressionen in Körperzellen einhergehen,
- Krankheiten, die auf der mitogenen Wirkung von Thrombin beruhen,
- Krankheiten, die auf einer thrombinabhängigen Kontraktilitäts- und Permeabilitätsveränderung von Epithelzellen (z.B. Gefäßendothelzellen) beruhen,
- thrombinabhängige, thromboembolische Ereignisse wie tiefe Venenthrombose, Lungenembolie, Myocard- oder Cerebralinfarkt, Vorhofflimmern, Bypassverschluß,

- disseminierte intravasale Koagulation (DIC),
 - Reokklusion und zur Verkürzung der Reperfusionszeit bei Komedikation mit Thrombolytika wie Streptokinase, Urokinase, Prourokinase, t-PA, APSAC, Plasminogenaktivatoren aus den Speicheldrüsen von Tieren sowie die rekombinanten und mutierten Formen all dieser Substanzen,
 - das Auftreten von früher Reokklusion und später Restenosisierung nach PTCA,
 - die thrombinabhängige Proliferation von Glattmuskelzellen,
 - die Akkumulation aktiven Thrombins im ZNS (z.B. bei M. Alzheimer),
 - das Tumorwachstum sowie gegen die Adhäsion und Metastasierung von Tumorzellen.
- 20 Insbesondere lassen sich die neuen Verbindungen zur Therapie und Prophylaxe von thrombinabhängigen thromboembolischen Ereignissen wie tiefen Venenthrombosen, Lungenembolien, Myocard- oder Cerebralinfarkten und instabiler Angina, weiterhin zur Therapie der Disseminierten Intravasalen Koagulation (DIC) einsetzen. Weiter
- 25 eignen sie sich zur Kombinationstherapie mit Thrombolytika wie Streptokinase, Urokinase, Prourokinase, t-PA, APSAC und anderen Plasminogenaktivatoren zur Verkürzung der Reperfusionszeit und Verlängerung der Reokklusionszeit.
- 30 Weitere bevorzugte Anwendungsgebiete sind die Verhinderung thrombinabhängiger früher Reokklusion und später Restenosisierung nach perkutaner transluminaler koronarer Angioplastie, die Verhinderung thrombininduzierter Proliferation glatter Muskelzellen, die Verhinderung der Akkumulation aktiven Thrombins im ZNS (z.B.
- 35 bei M. Alzheimer), die Tumorbekämpfung und die Verhinderung von Mechanismen, die zu Adhäsion und Metastasierung von Tumorzellen führen.
- Die neuen Verbindungen lassen sich auch zur Beschichtung von
- 40 künstlichen Oberflächen wie Hämodialysemembranen und den dazu erforderlichen Schlauchsystemen und Leitungen sowie von Oxygenatoren der extravasalen Zirkulation, Stents und Herzklappen verwenden.
- 45 Die neuen Verbindungen lassen sich weiter bei Krankheiten einsetzen, deren Pathomechanismus direkt oder indirekt auf der proteolytischen Wirkung von Kininogenasen, insbesondere

Kallikrein beruht z.B. bei Entzündungskrankheiten wie Asthma, Pankreatitis, Rhinitis, Arthritis, Urticaria und anderen inneren Entzündungskrankheiten.

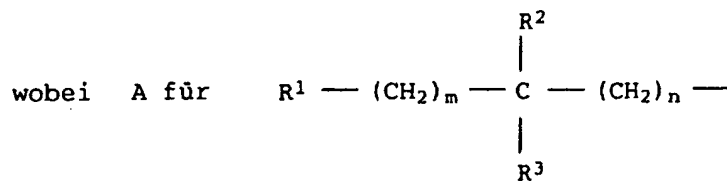
- 5 Der besondere Vorteil der neuen Verbindungen liegt darin, daß sie durch Austausch von Prolin gegen 3,4-Dehydroprolin und durch Austausch von Pipecolinsäure gegen 4,5-Dehydropipecolinsäure eine verbesserte pharmakologische Wirkung zeigen und sich daher von den in WO 94/29336 beschriebenen Verbindungen hervorheben.
- 10 Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in üblicher Weise oral oder parenteral (subkutan, intravenös, intramuskulär, intraperitoneal, rektal) verabfolgt werden. Die Applikation kann auch mit Dämpfen oder Sprays durch den Nasen-Rachenraum erfolgen.
- 15 Die Dosierung hängt vom Alter, Zustand und Gewicht des Patienten sowie von der Applikationsart ab. In der Regel beträgt die tägliche Wirkstoffdosis pro Person zwischen etwa 10 und 2000 mg bei oraler Gabe und zwischen etwa 1 und 200 mg bei parenteraler
- 20 Gabe. Diese Dosis kann in 2 bis 4 Einzeldosen oder einmalig am Tag als Depotform gegeben werden.

- Die neuen Verbindungen können in den gebräuchlichen galenischen Applikationsformen fest oder flüssig angewendet werden, z.B. als
- 25 Tabletten, Filmtabletten, Kapseln, Pulver, Granulate, Dragees, Suppositorien, Lösungen, Salben, Cremes oder Sprays. Diese werden in üblicher Weise hergestellt. Die Wirkstoffe können dabei mit den üblichen galenischen Hilfsmitteln wie Tablettenbindern, Füllstoffen, Konservierungsmitteln, Tablettensprengmitteln, Fließ-
- 30 reguliermitteln, Weichmachern, Netzmitteln, Dispergiermitteln, Emulgatoren, Lösungsmitteln, Retardierungsmitteln, Antioxidantien und/oder Treibgasen verarbeitet werden (vgl. H. Sucker et al.: Pharmazeutische Technologie, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1978).
- Die so erhaltenen Applikationsformen enthalten den Wirkstoff
- 35 normalerweise in einer Menge von 0,1 bis 99 Gew.-%.

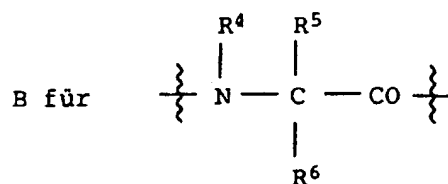
Experimenteller Teil

- Die Verbindungen der Formel I lassen sich entsprechend Schemata
- 40 I-III darstellen,

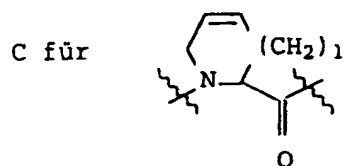
14



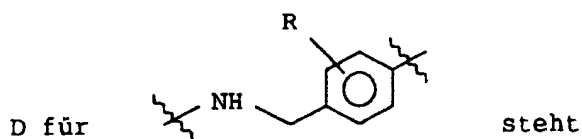
5



10



15



20

und E die in den Schemata angegebene Bedeutung besitzt. Die Reste
 25 R, R¹, R², R³, R⁴, R⁵ und R⁶ sowie l, m und n haben die oben
 angegebene Bedeutung.

Die Bausteine A, B, C und D werden vorzugsweise vorher separat
 aufgebaut und in geeignet geschützter Form (siehe Schema I-III)
 30 eingesetzt.

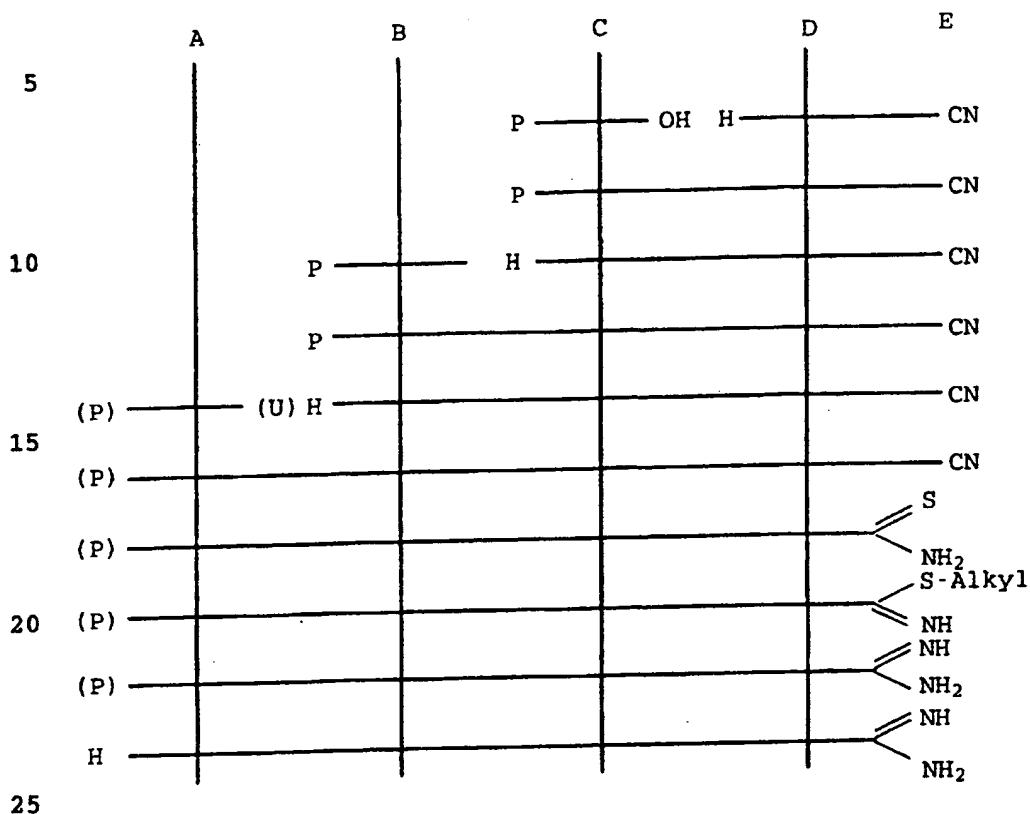
Die Verbindungen der Formel I lassen sich ausgehend von den ent-
 sprechend geschützten Bausteinen A, B, C, D und E nach Schema
 I-III herstellen.

35

40

45

Schema I

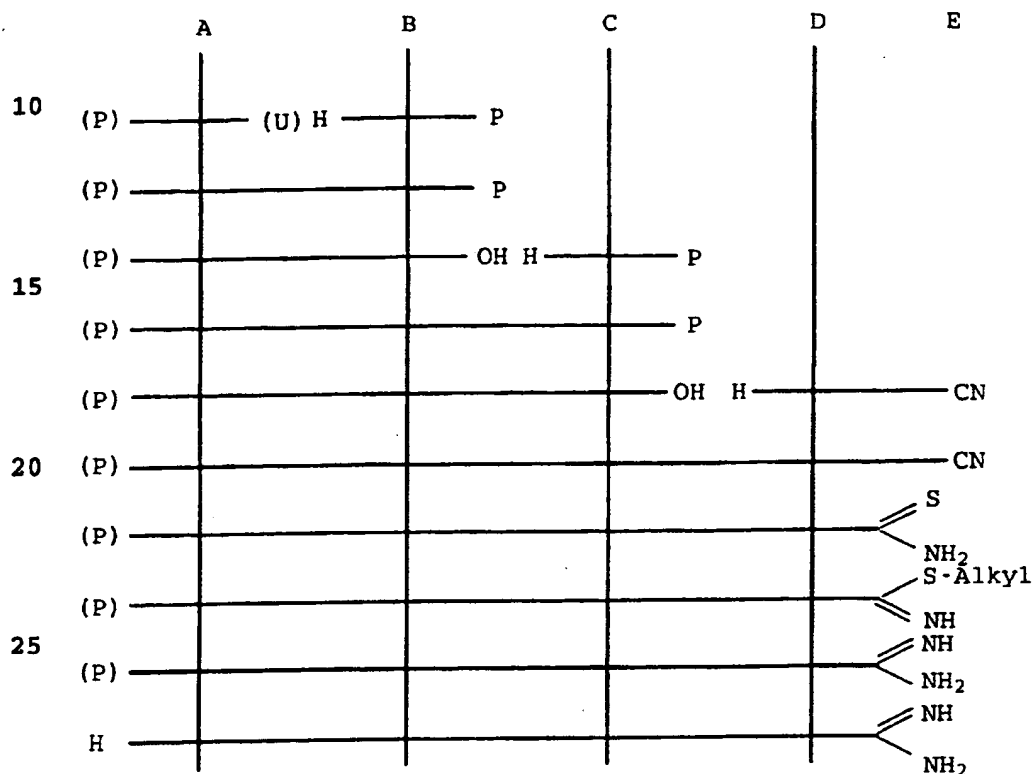


(P = Schutzgruppe, (P) = Schutzgruppe oder H, (U) = Abgangsgruppe oder gegebenenfalls Aldehyd bzw. Keton, siehe nachfolgenden Text)

- 30 Schema I beschreibt den linearen Aufbau des Moleküls I durch Kupplung des Amins H-D-CN mit der N-geschützten Aminosäure P-C-OH zu P-C-D-CN, Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe zu H-C-D-CN, Kupplung mit der N-geschützten Aminosäure P-B-OH zu P-B-C-D-CN, Abspaltung der Schutzgruppe P zu H-B-C-D-CN, 35 anschließende Alkylierung mit dem gegebenenfalls geschützten (P)-A-U-Baustein (U = Abgangsgruppe) oder reduktive Aminierung mit (P)-A'-U (U = Aldehyd, Keton) oder Michael-Addition mit einem geeigneten (P)-A''-C=C-Derivat zu (P)-A-B-C-D-CN. Die Umwandlung 40 der Nitrilfunktion in die Amidgruppe erfolgt entweder über die klassische Pinner-Synthese (R. Boder, D.G. Neilson, Chem. Rev. 1962, 61, 179) oder über eine modifizierte Pinner-Synthese, die über Iminothioestersalze als Zwischenstufe abläuft (H. Vieweg et al., Pharmazie 1984, 39, 226) oder direkt nach 45 der Methode von A. Eschenmoser Helv. Chimica Acta 69 (1986) 1224. Anschließend werden im Molekül noch vorhandene Schutzgruppen vorzugsweise durch saure Hydrolyse abgespalten.

Wird der Baustein D als $H-D-CONH_2$ in der Synthese eingebaut, so erfolgt auf einer der geschützten Zwischenstufen die Dehydratisierung der Amid- zur Nitrilfunktion.

5 Schema II



30

Schema II beschreibt den linearen Aufbau des Moleküls I durch Alkylierung, reduktive Aminierung oder Michael-Addition von H-B-P an entsprechend geeignete gegebenenfalls geschützte A-Bausteine zu (P)-A-B-P, Abspaltung der C-terminalen Schutzgruppe zu

35

(P)-A-B-OH, Kupplung mit H-C-P zu (P)-A-B-C-P, Abspaltung der C-terminalen Schutzgruppe zu (P)-A-B-C-OH, Kupplung mit H-D-CN zu (P)-A-B-C-D-CN und Umsetzung dieses Zwischenprodukts zum Endprodukt analog Schema I.

40

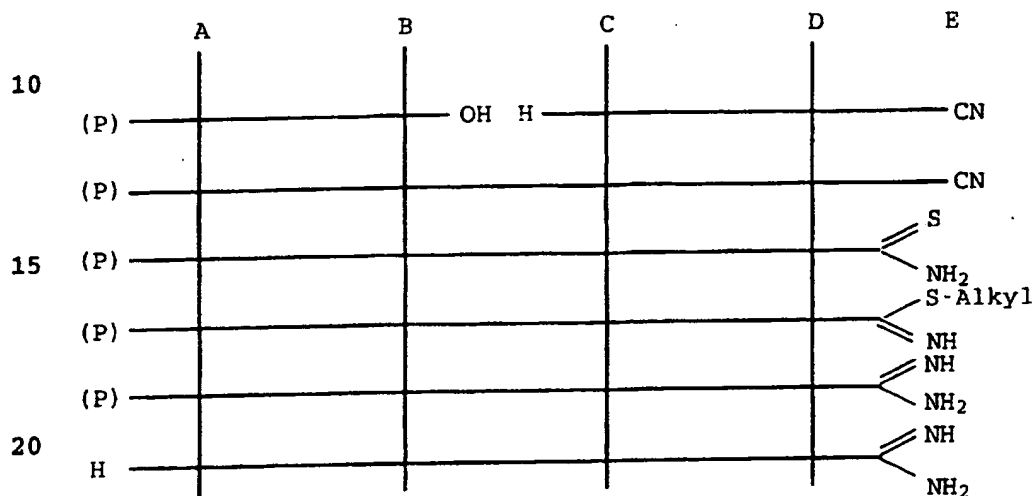
Bei Verbindungen (P)-A-B-P mit noch freier NH-Funktion an B muß diese vor Abspaltung der C-terminalen Schutzgruppe noch mit einer geeigneten Schutzgruppe versehen werden. Die jeweils verwendeten Schutzgruppen müssen orthogonal zueinander sein.

45

Alternativ zum H-D-CN-Baustein kann auch H-D-CONH₂, H-D-C(NH)NH₂, H-D-C(NP)NH₂, H-D-C(NP)NHP eingesetzt werden, wobei im ersten Fall das gekuppelte Zwischenprodukt (P)-A-B-C-D-CONH₂ zu (P)-A-B-C-D-CN dehydratisiert wird.

5

Schema III



Schema III beschreibt einen sehr effizienten Weg zur Darstellung der Verbindungen I durch eine konvergente Synthese. Die entsprechend geschützten Bausteine (P)-A-B-OH und H-C-D-CN werden miteinander gekuppelt und das entstandene Zwischenprodukt (P)-A-B-C-D-CN analog Schema I zum Endprodukt umgesetzt.

Als N-terminale Schutzgruppen werden Boc, Cbz oder Fmoc, vorzugsweise Boc eingesetzt, C-terminale Schutzgruppen sind Methyl, tert.-Butyl und Benzyl. Sind mehrere Schutzgruppen im Molekül vorhanden, so müssen diese orthogonal zueinander sein, wenn sie nicht gleichzeitig abgespalten werden sollen. Enthalten die Zwischenprodukte den Baustein C, sind Cbz- und Benzylschutzgruppen ungeeignet.

Die erforderlichen Kupplungsreaktionen sowie die üblichen Reaktionen der Schutzgruppeneinführung und -abspaltung werden nach Standardbedingungen der Peptidchemie durchgeführt (siehe M. Bodanszky, A. Bodanszky "The Practice of Peptide Synthesis", 2. Auflage, Springer Verlag Heidelberg, 1994).

Boc-Schutzgruppen werden mittels Dioxan/HCl oder TFA/DCM, Cbz-Schutzgruppen hydrogenolytisch oder mit HF abgespalten. Die Verseifung von Esterfunktionen erfolgt mit LiOH in einem

alkoholischen Lösungsmittel oder in Dioxan/Wasser. t-Butylester werden mit TFA gespalten.

Die Reaktionen wurden mittels DC kontrolliert, wobei üblicher-
5 weise folgende Laufmittel benutzt wurden:

- | | | |
|-------|----------------------|---------|
| A. | DCM/MeOH | 95:5 |
| B. | DCM/MeOH | 9:1 |
| C. | DCM/MeOH | 8:2 |
| 10 D. | DCM/MeOH/50 %ig HOAc | 40:10:5 |
| E. | DCM/MeOH/50 %ig HOAc | 35:15:5 |

Sofern säulenchromatographische Trennungen erwähnt werden, waren
dies Trennungen über Kieselgel, für die die oben genannten Lauf-
15 mittel verwendet wurden.

Reversed phase HPLC Trennungen wurden mit Acetonitril/Wasser und
HOAc Puffer durchgeführt.

20 Die Ausgangsverbindungen lassen sich nach folgenden Methoden her-
stellen:

Als Bausteine A werden für die Alkylierung z.B. α -Bromessigsäure-
tert.-butylester, β -Brompropionsäure-tert.-butylester, α -Brompro-
25 pionsäure-tert.-butylester, γ -Brombuttersäure-tert.-butylester,
 α -Brombuttersäure-tert.-butylester, THP-geschütztes Bromethanol,
THP-geschütztes γ -Brompropanol, α -Brom- γ -butyrolacton, für die
reduktive Aminierung z.B. Dihydroxyaceton, Acetondicarbonsäure-
di-tert.-butylester und für die Michael-Addition z.B. Acrylsäure-
30 tert.-butylester, Methacrylsäure-tert.-butylester, Fumarsäure-
tert.-butylester eingesetzt. Die genannten tert.-Butylester wer-
den, soweit sie nicht käuflich zu erwerben sind, analog G. Uray,
W. Lindner Tetrahedron 1988, 44, 4357-62 aus den entsprechenden
Carbonsäuren hergestellt.

35

B-Bausteine:

Für die allgemeine und spezielle Synthese von Aminosäuren stehen
in der Literatur vielfältige Möglichkeiten zur Verfügung. Eine
40 Übersicht hierzu bietet u.a. Band E16d/Teil 1 - Houben-Weyl,
S. 406 ff.

Häufig eingesetzte Edukte waren Benzophenoniminessigsäureethyl-
ester, Acetamidomalonsäurediethylester und Isonitrilessigsäure-
45 ethylester.

Die Darstellung verschiedener Glycin- und Alaninderivate erfolgte z.B. ausgehend von Isonitrileessigsäureethylester und einem entsprechenden Keton bzw. Aldehyd (siehe H.-J. Prätorius, J. Flossdorf, M.-R. Kula Chem. Ber. 1975, 108, 3079).

5

Die Synthesen von 2-Norbonylglycin, Adamantylalanin, γ -Methylcyclohexylalanin, 4-Isopropylcyclohex-1-yl-alanin, 4-Methylcyclohex-1-yl-alanin und 4-Methylcyclohex-1-ylglycin wurden über die entsprechenden 2-Formylamino-acrylsäureethylester (U. Schöllkopf und R. Meyer, Liebigs Ann. Chem. 1977, 1174) ausgehend von Isocyanessigsäureethylester mit den jeweiligen Carbonylverbindungen 2-Norbornanon, 1-Formyladamantan, 1-Formyl-1-methyl-cyclohexan, 1-Formyl-4-isopropyl-cyclohexan, 1-Formyl-4-methyl-cyclohexan und 4-Methylcyclohexanon nach folgenden allgemeinen Vorschriften

15 durchgeführt:

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der 2-Formylaminoacrylsäureethylester

20 Zu 100 mMol Kalium-tert.-butylat in 150 ml THF tropft man bei 0 bis -10°C die Lösung von 100 mMol Isocyanessigsäureethylester in 50 ml THF. Nach 15 min fügt man bei gleicher Temperatur 100 mMol der entsprechenden Carbonylverbindung in 50 ml THF zu, läßt die Reaktionsmischung langsam auf RT ansteigen und zieht das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer ab. Der Rückstand wird mit 50 ml

25 Wasser, 100 ml Essigsäure und 100 ml DCM vermischt und das Produkt mit DCM extrahiert. Die DCM-Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Die fast rein anfallenden Produkte können im Bedarfsfall säulenchromatographisch über Kieselgel (Laufmittel: Gemische aus Ether/

30 Petrolether) weiter gereinigt werden.

Allgemeine Vorschrift der Aminosäurehydrochloride ausgehend von den 2-Formylamino-acrylsäureethylestern

35

100 mMol der 2-Formylamino-acrylsäureethylester werden mit Pd/C (10 %)-Wasserstoff in 200 ml Eisessig bis zur vollständigen Umsetzung hydriert. Dann wird der Katalysator abfiltriert, die Essigsäure so weit wie möglich am Rotationsverdampfer abgezogen

40 und der Rückstand in 200 ml halbkonzentrierter Salzsäure 5 h zum Rückfluß erhitzt. Man zieht die Salzsäure am Rotationsverdampfer ab, trocknet das Produkt bei 50°C im Vakuum und wäscht mehrmals mit Ether nach. Die Hydrochloride fallen als schwach gefärbte Kristalle an.

45

Ausgehend von 16,5 g (150 mMol) 2-Norbornanon erhielt man 26,6 g 2-Norbornylglycin-hydrochlorid. Ausgehend von 19,7 g (120 mMol) 1-Formyladamantan erhielt man 26,0 g Adamantylalanin-hydrochlorid. Ausgehend von 12,6 g (100 mMol) 1-Formyl-1-methyl-cyclohexan erhielt man 16,6 g γ -Methylcyclohexylalanin-hydrochlorid. Ausgehend von 16,8 g (150 mMol) 4-Methylcyclohexanon erhielt man 25,9 g (4-Methyl)-cyclohexylglycin-hydrochlorid.

Ausgehend von 15 g trans-1-Formyl-4-methylcyclohexan erhielt man 18 g trans-4-Methylcyclohex-1-yl-alanin-hydrochlorid.

Ausgehend von 9 g 3,3-Dimethyl-1-formylcyclohexan erhielt man 10 g 3,3-Dimethylcyclohex-1-yl-alaninhydrochlorid.

15 Der für die Synthese benötigte Aldehyd, 1-Formyl-3,3-dimethyl-cyclohexan, wurde in Anlehnung an Moskal und Leusen (Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 1987, 106, 137-141) dargestellt:

Eine Lösung von n-Butyl-lithium in n-Hexan (72 ml, 115 mmol) wurde innerhalb von 10 min bei -60°C zu einer gerührten Lösung von Diethylisocyanomethylphosphonat (17 ml, 105 mmol) in 280 ml wasserfreiem Diethylether getropft. Die entstandene Suspension wurde 15 min bei -60°C nachgerührt und innerhalb von 10 min mit einer Lösung von 3,3-Dimethylcyclohexanon (13 g, 105 mmol) in 100 ml wasserfreiem Diethylether versetzt, wobei die Temperatur unter -45°C gehalten wurde. Man ließ das Reaktionsgemisch auf 0°C kommen, rührte 90 min bei dieser Temperatur und gab vorsichtig 150-200 ml 38 %ige wäßrige Salzsäure hinzu. Zur vollständigen Hydrolyse wurde 15 h lang bei Raumtemperatur heftig gerührt. Man trennte die organische Phase ab, wusch sie mit je 200 ml Wasser, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung. Man trocknete über Magnesiumsulfat, filtrierte ab und engte am Rotationsverdampfer ein, um die Lösungsmittel zu entfernen. Der erhaltene Rückstand wurde ohne weitere Reinigung als Ausgangsmaterial für die Synthese der Aminosäure eingesetzt.

Boc-(D)- α -methyl-cyclohexylalanin:

40 3,4 g (12,2 mMol) Boc-(D)- α -Methyl-Phe-OH wurden in 100 ml MeOH bei 50°C in Gegenwart von 250 mg 5-%igem Rh auf Al₂O₃ 24 h bei 10 bar mit Wasserstoff hydriert. Man erhielt nach Filtration und Abziehen des Lösungsmittels 2,8 g Boc-(D)- α -Methyl-Cha-OH.

45 ¹H-NMR (DMSO-d₆, δ in ppm): 12 (sehr breites Signal, COOH); 1,7-0,8 (25 H; 1,35 (s, Boc), 1,30 (s, Me))

Boc-(3-Ph)-Pro-OH wurde analog einer Vorschrift von J.Y.L. Chung et al. (J.Y.L. Chung et al. J.Org.Chem. 1990, 55, 270) synthetisiert.

5 Darstellung von Boc-(D,L)-Dch-OH:

Boc-(D,L)-Dpa-OH (1mmol) wurde in 12 ml MeOH zusammen mit katalytischen Mengen von 5 % Rh/Al₂O₃ bei 5 bar hydriert. Nach Filtration und Entfernen des Solvens im Vakuum erhielt man das Produkt
10 in quantitativer Ausbeute.

Darstellung von H-(D,L)-Chea-OH:

4,0 g Cycloheptylmethylmethansulfonat (19,39 mMol), hergestellt
15 aus Cycloheptylmethanol und Methansulfonsäurechlorid, wurden zusammen mit 4,9 g Benzophenoniminyglycinethylester (18,47 mMol), 8,9 g trockenem fein gepulvertem Kaliumcarbonat (64,65 mMol) und 1 g Tetrabutylammoniumbromid (3 mMol) in 50 ml trockenem Acetonitril 10 h in Inertgasatmosphäre auf Rückfluß erhitzt. Danach
20 wurde das Kaliumcarbonat abfiltriert, das Filtrat zur Trockene eingedampft, und das Rohprodukt direkt mit 20 ml 2N Salzsäure in 40 ml Ethanol 1,5 h unter Rühren bei RT hydrolisiert. Nach Verdünnen der Reaktionslösung wurde mit Essigester im sauren Bereich Benzophenon extrahiert, anschließend im alkalischen Bereich
25 (pH = 9) H-(D,L)-Chea-OEt mit DCM extrahiert, die Lösung über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert. Ausbeute 3,7 g $\hat{=}$ 95 % der Theorie.

Die Darstellung von (D)-(1,4-Cyclohexadien-1-yl)ala-OH erfolgte
30 nach G. Zivlichovsky, V. Gurvich J. Chem. Soc. Perkin Trans I 19 (1995) 2509-15.

Die Darstellung von H-(D,L)- β,β -Me₂Cha-OH erfolgte nach U. Schöllkopf, R. Meyer, L. Ann. Chem. 1977, 1174-82.

35

Die genannten Aminosäuren wurden nach allgemein bekannten Verfahren mit Di-tert.-butyl-dicarbonat in Wasser/Dioxan in die jeweils Boc-geschützte Form überführt und anschließend aus Essigester/Hexan-Gemischen umkristallisiert oder säulenchromato-
40 graphisch über Kieselgel (Laufmittel: Essigester/Petrolether-Gemische) gereinigt.

Die Boc-geschützten Aminosäuren wurden als B-Bausteine entsprechend Schema I eingesetzt.

45

Die genannten Aminosäuren wurden als B-Bausteine teilweise auch in die entsprechenden Benzylester überführt, mit den entsprechend geschützten A-Bausteinen verknüpft und die Verbindungen mit noch freier N-H-Funktion anschließend mit einer Boc-Gruppe geschützt.

- 5 Die Benzylestergruppe wurde abhydriert und der Baustein A-B-OH durch Kristallisation, Salzfällung bzw. Säulenchromatographie gereinigt. Dieser Weg ist exemplarisch für $t\text{BuOOC-CH}_2\text{-(Boc)-(D)Cha}$ nachfolgend beschrieben.

10 Synthese von (D)-Cyclohexylalaninbenzylester:

- Eine Suspension von 100 g (481 mmol) D-Cyclohexylalanin-hydrochlorid, 104 g (962 mmol) Benzylalkohol und 110 g (577 mmol) p-Toluolsulfonsäuremonohydrat in 2200 ml Toluol wurde am Wasser-
- 15 abscheider langsam zum Rückfluß erhitzt. In einem Temperaturbereich von 80-90°C beobachtete man Chlorwasserstoffentwicklung sowie das Auflösen der Suspension zu einer klaren Lösung. Als sich kein Wasser mehr abschied (ca. 4 h), destillierte man 500 ml Toluol ab, ließ die Reaktionsmischung über Nacht abkühlen,
- 20 filtrierte den entstandenen Rückstand ab und wusch zweimal mit je 1000 ml Hexan nach. Der erhaltene Rückstand (195 g) wurde sodann in 2000 ml Dichlormethan aufgeschlämmt, mit 1000 ml Wasser versetzt und unter Rühren durch sukzessive Zugabe von 50 %iger Natronlauge auf pH 9-9,5 eingestellt. Man trennte die organische
- 25 Phase ab, wusch sie zweimal mit je 500 ml Wasser, trocknete sie über Natriumsulfat, filtrierte vom Trockenmittel ab und engte das Filtrat ein, wodurch man 115 g (94 %) des Produktes als helles Öl erhielt.

30 N-(tert.-butyloxycarbonylmethyl)-(D)-cyclohexylalaninbenzylester:

- 115 g (440 mmol) (D)-Cyclohexylalaninbenzylester wurden in 2000 ml Acetonitril gelöst, bei Raumtemperatur mit 608 g (4,40 mol) Kaliumcarbonat und 94 g (484 mmol) Bromessigsäure-
- 35 tert.-butylester versetzt und 3 Tage bei dieser Temperatur gerührt. Man filtrierte vom Carbonat ab, wusch mit Acetonitril nach, engte die Mutterlauge ein (30°C, 20 mbar), nahm den Rückstand in 1000 ml Methyl-tert.-butylether auf und extrudierte die organische Phase mit 5 %iger Zitronensäure und gesättigter
- 40 Natriumhydrogencarbonat-Lösung. Man trocknete die organische Phase über Natriumsulfat, filtrierte vom Trockenmittel ab, engte ein und setzte das erhaltene Öl (168 g) direkt in die folgende Reaktion ein.

N-Boc-N-(tert.-butyloxycarbonylmethyl)-(D)-cyclohexylalaninbenzylester:

Das in vorheriger Synthese erhaltene Öl (168 g, 447 mmol) wurde
5 in 1400 ml Acetonitril gelöst, mit 618 g (4,47 mol) Kalium-
carbonat-Pulver und 107 g (492 mmol) Di-tert.-butyldicarbonat
versetzt und 6 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Man saugte das
Kaliumcarbonat ab, wusch mit ca. 1000 ml Acetonitril nach und
engte das Filtrat ein. Man erhielt 230 g des gewünschten
10 Produkts.

N-Boc-N-(tert.-butyloxycarbonylmethyl)-(D)-cyclohexylalanin-
cyclohexylammoniumsalz:

15 115 g N-Boc-N-(tert.-butyloxycarbonylmethyl)-(D)-cyclohexyl-
alaninbenzylester wurden in 1000 ml reinem Ethanol gelöst und
bei 25-30°C in Gegenwart von 9 g 10 %igem Pd auf Aktivkohle 2 h
bei Normaldruck mit Wasserstoff hydriert. Nach Filtration und
Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer erhielt man
20 100 g (260 mmol) eines gelben Öls, das man in 1600 ml Aceton
aufnahm und zum Rückfluß erhitzte. Man entfernte das Heizbad
und gab über einen Tropftrichter zügig eine Lösung von 27 g
(273 mmol) Cyclohexylamin in Aceton hinzu. Beim Abkühlen der
Reaktionsmischung auf Raumtemperatur kristallisierte das ge-
25 wünschte Salz aus. Man filtrierte den Feststoff ab, wusch mit
200 ml Aceton nach und kristallisierte zur endgültigen Reinigung
noch einmal aus Aceton um. Nach Trocknung des Rückstandes im
Vakuumtrockenschrank bei 30°C erhielt man 70,2 g des gewünschten
Salzes als weißes Pulver.
30 Das als C-Baustein eingesetzte (L)-3,4-Dehydroprolin ist käuflich
zu erwerben, die (D,L)-4,5-Dehydropipecolinsäure läßt sich
J. Org. Chem. 25 (1960), 489 oder C. Herdeis, W. Engel
Arch. Pharm. 326 (1993), 297 herstellen und anschließend mit
35 Boc₂O in Boc(D,L)-Dep-OH überführen.

Die Synthese der D-Bausteine ist in DE 444 33 90 beschrieben.

40

45

Beispiel 1

N-Hydroxycarbonyl-methylen-(D)-cyclohexylalanyl-3,4-dehydroprolyl-(4-amidino)-benzylamid:

5

Boc-3,4-Dehydroprolyl-4-cyanobenzylamid:

Boc-3,4-Dehydroprolin (4,7 g, 22,0 mmol) und 4-Cyanobenzylamin (4,1 g, 24,2 mmol; DE 444 33 90) wurden in Dichlormethan (25 ml) gelöst. Die Lösung wurde auf 0°C gekühlt und mit Ethyldiisopropylamin (26,4 ml, 154 mmol) versetzt. Anschließend wurde 50 %iges Propanphosphonsäureanhydrid in Essigsäureethylester (23,3 ml, 110 mmol) langsam zugetropft. Es wurde 1 h bei 0°C und 30 min bei Raumtemperatur nachgerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Dichlormethan verdünnt und mit verdünnter Natriumhydrogensulfatlösung (3 x), verdünnter Natriumhydrogencarbonatlösung (3 x), gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde im Wasserstrahlvakuum eingeeengt. Man erhielt 7,47 g Rohprodukt.

20

3,4-Dehydroprolyl-4-cyanobenzylamid:

Das aus dem vorangegangenen Versuch erhaltene Rohprodukt von Boc-3,4-Dehydroprolyl-4-cyanobenzylamid (7,47 g) wurde in Dichlormethan (88 ml) gelöst und mit etherischer Salzsäurelösung (88 ml, 5 M) versetzt. Anschließend wurde 1,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Wasserstrahlvakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde 2 x mit Dichlormethan versetzt und das Lösungsmittel im Wasserstrahlvakuum erneut abdestilliert. Anschließend wurde 2 x mit Diethylether ausgerührt. Man erhielt 5,32 g Rohprodukt.

N-(tert.-Butoxycarbonyl-methylen)-(N-BOC)-(D)-cyclohexylalanyl-3,4-dehydroprolyl-4-cyanobenzylamid:

35

tBuOOC-CH₂-(Boc)-(D)-Cha-OH (7,59 g, 19,68 mmol) und H-Pyr-4-cyanobenzylamid (5,19 g, 19,68 mmol) wurden in Dichlormethan (100 ml) gelöst und mit Ethyldiisopropylamin (12,72 g, 98,4 mmol) versetzt. Die Lösung wurde auf 0°C gekühlt und 50 %ige Propanphosphonsäureanhydrid in Essigsäureethylester (20 ml) in 20 min zugetropft nach 3 h Rühren bei 0-10°C wurde mit Dichlormethan (100 ml) verdünnt, mit 10 %iger Natriumhydrogensulfatlösung (3 x), gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (2 x) und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel im Wasserstrahlvakuum abdestilliert. Man erhielt 13,28 g als leicht bräunliches Öl.

N-(tert.-Butoxycarbonyl-methylen)-(N-Boc)-(D)-cyclohexylalanyl-3,4-dehydroprolyl-4-aminothiocarbonylbenzylamid:

Das aus dem vorangegangenen Versuch erhaltene Rohprodukt von
5 t-BuOOC-CH₂-(Boc)-(D)-Cha-Pyr-4-cyano-benzylamid (13,28 g) wurde
in Pyridin (70 ml) und Triethylamin (12 ml) gelöst, auf 0°C
gekühlt und die Lösung mit Schwefelwasserstoff gesättigt (Lösung
färbte sich grün). Anschließend wurde 48 h bei Raumtemperatur
gerührt. Der überschüssige Schwefelwasserstoff wurde mit Stick-
10 stoff verdrängt und das Lösungsmittel im Wasserstrahlvakuum
abdestilliert. Der Rückstand wurde in Diethylether gelöst und 3 x
mit 20 %iger Natriumhydrogensulfatlösung, gesättigter Natrium-
hydrogencarbonatlösung (2 x) und Wasser gewaschen. Nach Trocknen
über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel im Wasserstrahlvakuum
15 abdestilliert. Das Rohprodukt (14,3 g) wurde mittels Flash-
chromatographie (Kieselgel, Gradient von Dichlormethan bis
Dichlormethan:Methanol = 50:1) gereinigt. Ausbeute: 13,3 g
(leicht lösungsmittelhaltig).

20 N-(tert.-Butoxycarbonyl-methylen)-(N-Boc)-(D)-cyclohexylalanyl-
3,4-dehydroprolyl-4-S-methyliminocarbonylbenzylamid:

Das aus dem vorangegangenen Versuch erhaltene t-BuOOC-CH₂-(Boc)-
(D)-Cha-Pyr-aminothiocarbonyl-benzylamid (13,3 g) wurde in
25 Dichlormethan (135 ml) mit Methyljodid (7,97 ml, 126,90 mmol)
versetzt. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungs-
mittel im Wasserstrahlvakuum abdestilliert. Man erhielt 15,73 g
eines leicht gelblichen Öls.

30 N-(tert.-Butoxycarbonyl-methylen)-(N-Boc)-(D)-cyclohexylalanyl-
3,4-dehydroprolyl-4-amidinobenzylamid:

Das aus dem vorangegangenen Versuch erhaltene Rohprodukt von
t-BuOOC-CH₂-(Boc)-(D)-Cha-Pyr-4-S-methyliminocarbonyl-benzylamid-
35 hydroiodid (15,73 g) wurde in Acetonitril (1290 ml) gelöst und
mit Ammoniumacetat (3,25 g, 42,3 mmol) versetzt. Anschließend
wurde 1,5 h auf 50°C erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde im
Wasserstrahlvakuum eingeengt und mit Dichlormethan versetzt. Die
ausgefallenen Salze wurden abfiltriert und das Filtrat im Wasser-
40 strahlvakuum eingeengt. Man erhielt 15,17 g eines gelblichen
Schaumes. Das Rohprodukt wurde über einen Ionenaustauscher
(Fluka, Bestell-Nr. 00402, Acetat auf polymerem Träger) in das
Acetatsalz überführt. Ausbeute: 13,3 g.

N-(Hydroxycarbonyl-methylen)-(D)-cyclohexylalanyl-3,4-dehydropropyl-(4-amidino)-benzylamid:

t-BuOOC-CH₂-(Boc)-(D)-Cha-Pyr-4-amidino-benzylamid-hydroacetat
5 (13,3 g) wurde in Dichlormethan (200 ml) gelöst und mit etherischer HCl (45 ml) versetzt. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wurde im Wasserstrahlvakuum bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde 2 x mit Dichlormethan versetzt und das Lösungsmittel im Wasserstrahlvakuum abdestilliert. Man
10 erhielt 11,6 g Rohprodukt.

Ein Teil des Rohprodukts (3 g) wurde über einen Ionenaustauscher (Fluka, Bestell-Nr. 00402, Acetat auf polymerem Träger) in das Acetatsalz überführt. Das so erhaltene Produkt (2,9 g) wurde
15 mittels Flashchromatographie gereinigt (Kieselgel, Gradient von Dichlormethan:Methanol = 4:1 über Dichlormethan:Methanol:50 %ige Essigsäure = 40:10:2 bis Dichlormethan:Methanol:50 %ige Essigsäure = 35:15:5). Man erhielt ein gelbliches Öl, das in Wasser gelöst wurde. Nach Filtration wurde das Filtrat gefrier-
20 getrocknet. Ausbeute: 2,13 g eines farblosen Feststoffes. FAB-MS (M+H⁺): 456.

Analog Beispiel 1 wurden hergestellt:

25 2. N-(Hydroxycarbonyl-methylen)-(D)-cyclohexylglycyl-3,4-dehydropropyl-(4-amidino)-benzylamid:

FAB-MS (M+H⁺): 442

30 3. N-(Hydroxycarbonyl-methylen)-(D,L)-cycloheptylalanyl-3,4-dehydropropyl-(4-amidino)-benzylamid:

FAB-MS (M+H⁺): 470

35 4. N-(Hydroxycarbonyl-methylen)-(D)-tert.-butylalanyl-3,4-dehydropropyl-(4-amidino)-benzylamid:

FAB-MS (M+H⁺): 430

40 5. N-(Hydroxycarbonyl-methylen)-(D)-cyclohexylalanyl-4,5-dehydro-pipecolyl-(4-amidino)-benzylamid:

FAB-MS (M+H⁺): 470

45 Die antithrombotische Wirkung der neuen Verbindungen wurde am arteriovenösen Shunt an der Ratte gezeigt. In diesem Experiment dient eine Glaskapillare in einem arteriovenösen Shunt als künst-

- liche thrombogene Oberfläche und löst eine Thrombose aus. Die narkotisierte (Urethan 25 %, 2 x 8 mg/kg i.p.) Ratte wird in Rückenlage auf einer temperierten (37°C) Wärmebank fixiert. In die freipräparierte rechte A. carotis und V. jugularis werden kurze
- 5 Polyethylene-Katheter (Portex, PE 50) implantiert, mit physiol. NaCl-Lösung gefüllt und durch Klemmen verschlossen. Die freien Enden der Katheter werden durch eine 20,0 mm lange Glaskapillare (Innendurchmesser 1,0 mm) verbunden, die als thrombogene Oberfläche wirkt. Die Applikation der Prüfsubstanz kann i.v., s.c.,
- 10 p.o. oder als Infusion erfolgen. Nach der gewünschten Inkubationszeit mit der Prüfsubstanz oder Lösungsmittel (Kontrolle) wird der Shunt durch Entfernen der Klemmen geöffnet. Der Blutstrom durch den Shunt führt zu einem schnellen Anstieg der Shunttemperatur, die an der Mitte der Glaskapillare gemessen wird.
- 15 Die Erhöhung von Raumtemperatur auf Körpertemperatur ist ein Indikator für die Durchgängigkeit des Shunts. Die Temperatur wird bis zum Verschuß des Shunts kontinuierlich aufgezeichnet. Bei Öffnung des Shunts und am Ende des Experiments werden zusätzlich Blutproben zur Bestimmung der anti-FIIa-Aktivität im Plasma ent-
- 20 nommen.

Pharmakokinetik und Gerinnungsparameter in Hunden

- Die Testsubstanzen werden unmittelbar vor der Verabreichung an
- 25 wache Mischlingshunde in isotonischer Salzlösung gelöst. Die Applikationsvolumina betragen 0,1 ml/kg für die intravenöse Bolus-Injektion und 1 ml/kg für die orale Verabreichung, die per Schlundsonde erfolgt. Vor sowie 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 und 360 min (bei Bedarf nach 420, 480 min und 24 h)
- 30 nach intravenöser Applikation von 1,0 mg/kg bzw. vor sowie 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 480 min und 24 h nach oraler Gabe von 4,64 mg/kg werden Proben venösen Blutes (2 ml) in Citrat-Röhrchen genommen. Direkt nach der Probennahme wird die Ecarinzeit (ECT = ecarin clotting time) im Ganzblut bestimmt.
- 35 Nach der Präparation des Plasmas durch Zentrifugation werden die Plasma-Thrombinzeit und die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (APTT = activated partial thromboplastin time) mit Hilfe eines Koagulometers bestimmt.
- 40 Zusätzlich werden die anti-F IIa-Aktivität (ATU/ml) und die Konzentration der Substanz durch ihre anti-F IIa-Aktivität im Plasma mittels chromogenem (S-2238) Thrombin-Assay bestimmt, wobei Eichkurven mit r-Hirudin und der Testsubstanz eingesetzt wurden.

- Die Plasmakonzentration der Testsubstanz ist Grundlage zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter: Zeit der maximalen Plasmakonzentration (T_{max}), maximale Plasmakonzentration; Plasma-Halbwertszeit, $T_{0,5}$; Fläche unter der Kurve (AUC); 5 resorbierter Teil der Testsubstanz (F).

Gerinnungs-Parameter:

- Ecarinzeit (ECT = ecarin clotting time): 100 μ l citratbehandeltes Blut werden 2 min bei 37°C in einem Koagulometer inkubiert (CL 8, Kugel-Typ, Bender & Hobein, München, BRD). Nach Zugabe von 100 μ l vorgewärmtem (37°C) Ecarin-Reagenz (Pentapharm) wird die Zeit bis zur Bildung eines Fibrin-Clots bestimmt.
- 15 Aktivierter Thromboplastinzeit (APTT = activated thromboplastin time): 50 μ l citratbehandeltes Plasma und 50 μ l des PTT-Reagenzes (Pathrombin, Behring) werden gemischt und 2 min bei 37°C in einem Koagulometer inkubiert (CL 8, Kugel-Typ, Bender & Hobein, München, BRD). Nach der Zugabe von 50 μ l vorgewärmtem (37°C) Calciumchlorid wird die Zeit bis zur Bildung eines Fibrin-Clots bestimmt.

- Thrombinzeit (TT): 100 μ l citratbehandeltes Plasma wird 2 min bei 37°C in einem Koagulometer inkubiert (CL 8, Kugel-Typ, Bender & Hobein, München, BRD). Nach der Zugabe von 100 μ l vorgewärmtem (37°C) Thrombin-Reagenz (Boehringer Mannheim) wurde die Zeit bis zur Bildung eines Fibrin-Clots bestimmt.
- 25

- In diesen Versuchen zeigten die neuen Verbindungen eine gute Wirkung.
- 30

35

40

45

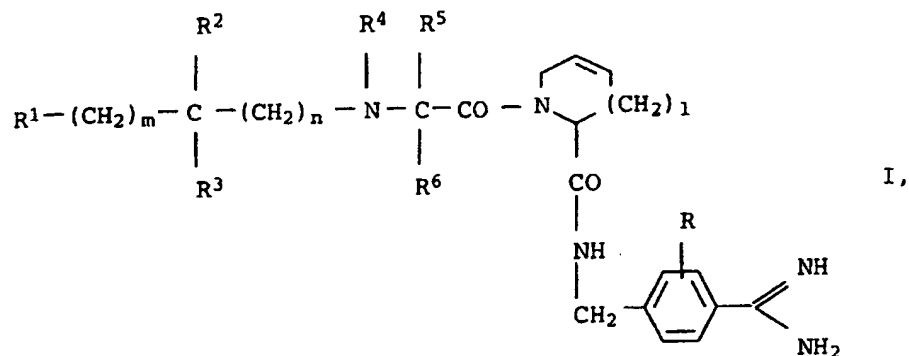
Patentansprüche

1. Verbindungen der Formel I

5

10

15



20

worin die Reste R, R¹, R², R³, R⁴, R⁵ und R⁶ sowie 1, m und n folgende Bedeutungen besitzen:

25

30

35

40

45

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 1 | 0 oder 1, |
| m | 0, 1 oder 2, |
| n | 0, 1 oder 2, |
| R | H oder C ₁₋₄ -Alkyl-, |
| R ¹ | HOOC-, C ₁₋₆ -Alkyl-OOC-, Benzyl-OOC- oder -OH, |
| R ² | H-, C ₁₋₄ -Alkyl- oder R ¹ -(CH ₂) _m -, |
| R ³ | H- oder C ₁₋₄ -Alkyl-, welches durch -OH oder -COOH substituiert sein kann, |
| R ⁴ | H-, C ₁₋₄ -Alkyl-, HOOC-C ₁₋₄ -alkylen-, |
| R ⁵ | C ₁₋₈ -Alkyl-, Cycloalkyl-(CR ⁸ R ⁹) _r -, (r = 0 oder 1, R ⁸ , R ⁹ = H-, Cycloalkyl- oder C ₁₋₄ -Alkyl-), worin bis zu vier CH ₂ -Gruppen des Cycloalkylrestes unabhängig voneinander durch CR ¹⁰ R ¹¹ (R ¹⁰ = H- oder C ₁₋₄ -Alkyl-, R ¹¹ = C ₁₋₄ -Alkyl-) und/oder die an CR ⁸ R ⁹ gebundene CH-Gruppe des Cycloalkylrestes durch CR ¹² (R ¹² = C ₁₋₄ -Alkyl-) ersetzt sein können und/oder eine oder zwei C-C-Einfachbindung(en) im Ring durch eine C=C-Doppelbindung ersetzt sein können, |
| R ⁶ | H-, C ₁₋₄ -Alkyl- oder |
| R ⁴ und R ⁵ | zusammen -CH ₂ -CH ₂ -CH(R ⁷)-, (R ⁷ = H-, Phenyl- oder Cyclohexyl-) |

R² und R⁵ zusammen -CH₂-CH₂- oder -CH₂-CH₂-CH₂-, worin ein Wasserstoffatom durch C₁₋₄-Alkyl-, Phenyl- oder Cycloalkyl- ersetzt sein kann,

5 sowie deren Salze mit physiologisch verträglichen Säuren.

2. Verbindungen der Formel I gemäß Anspruch 1 zur Verwendung bei der Bekämpfung von Krankheiten.

10 3. Verwendung der Verbindungen der Formel I gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von Arzneimitteln gegen:

- 15 • Krankheiten, deren Pathomechanismus direkt oder indirekt auf der proteolytischen Wirkung von Thrombin beruht,
- Krankheiten, deren Pathomechanismus auf der thrombinabhängigen Aktivierung von Rezeptoren und Signaltransduktionen beruht,
- 20 • Krankheiten, die mit Stimulation oder Inhibition von Genexpressionen in Körperzellen einhergehen,
- Krankheiten, die auf der mitogenen Wirkung von Thrombin beruhen,
- Krankheiten, die auf einer thrombinabhängigen Kontraktilitäts- und Permeabilitätsveränderung von Epithelzellen beruhen,
- 25 • thrombinabhängige, thromboembolische Ereignisse,
- disseminierte intravasale Koagulation,
- Reokklusion und zur Verkürzung der Reperfusionszeit bei Komedikation mit Thrombolytika,
- 30 • das Auftreten von früher Reokklusion und später Restenosierung nach PTCA,
- die thrombinabhängige Proliferation von Glatt-muskelzellen,
- die Akkumulation aktiven Thrombins im ZNS,
- 35 • das Tumorwachstum sowie gegen die Adhäsion und Metastasierung von Tumorzellen.

4. Verbindungen der Formel I gemäß Anspruch 1 zur Beschichtung von Oberflächen.

40

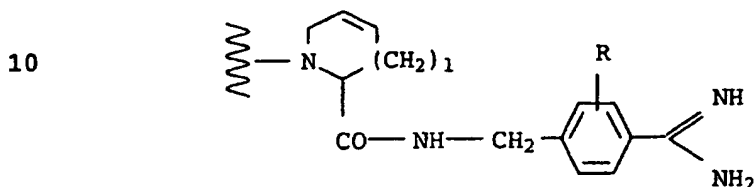
5. Verwendung der Verbindungen der Formel I gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von Arzneimitteln gegen:

- 45 • Krankheiten, deren Pathomechanismus direkt oder indirekt auf der proteolytischen Wirkung von Kininogenasen, insbesondere Kallikrein beruht,

- Entzündungskrankheiten wie Asthma, Pankreatitis, Rhinitis, Arthritis, Urticaria und anderen inneren Krankheiten, bei denen Kallikrein eine Rolle spielt.

5

6. Verbindungen enthaltend ein strukturelles Fragment der Formel

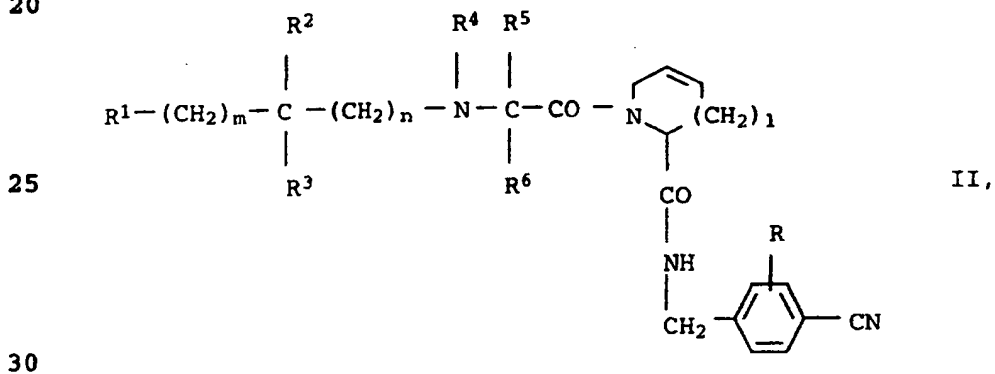


15

worin 1 = 0 oder 1 und R = H- oder C₁₋₄-Alkyl- bedeutet.

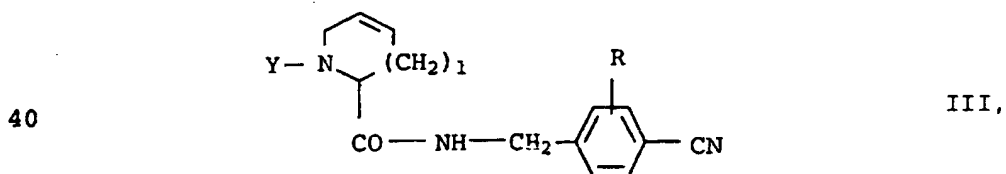
7. Verbindungen der Formel

20



worin die Reste R, R¹, R², R³, R⁴, R⁵ und R⁶ sowie 1, m und n die in Anspruch 1 genannten Bedeutungen besitzen.

35 8. Verbindungen der Formel



45 worin 1 und R die Bedeutung gemäß Anspruch 1 besitzt und Y eine N-Schutzgruppe, eine N-terminal geschützte oder ungeschützte Aminosäure oder H- bedeutet.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr application No
PCT/EP 97/04105

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K5/02 C07D207/22 C07D211/78 A61K38/05

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C07D A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 29336 A (ASTRA AB) 22 December 1994 cited in the application see the whole document	1-8
P, X	WO 96 25426 A (BASF) 22 August 1996 see the whole document	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 November 1997

Date of mailing of the international search report

20/11/1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Continuation on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/04105

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9429336 A	22-12-94	AU 6986994 A	03-01-95
		BR 9406746 A	19-03-96
		CA 2162900 A	22-12-94
		CN 1127509 A	24-07-96
		CZ 9503020 A	17-04-96
		EP 0701568 A	20-03-96
		FI 955828 A	04-12-95
		HR 940311 A	31-10-96
		HU 74739 A	28-02-97
		JP 8511018 T	19-11-96
		LT 1947 A, B	27-12-94
		MX 9404114 A	31-01-95
		NO 954873 A	01-02-96
		NZ 267534 A	22-08-97
		PL 311819 A	18-03-96
		SK 145495 A	01-10-96
		US 5602253 A	11-02-97
WO 9625426 A	22-08-96	AU 4875196 A	04-09-96
		FI 973360 A	15-08-97

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter: r 1 Aktenzeichen

PCT/EP 97/04105

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K5/02 C07D207/22 C07D211/78 A61K38/05

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07K C07D A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 94 29336 A (ASTRA AB) 22. Dezember 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1-8
P, X	WO 96 25426 A (BASF) 22. August 1996 siehe das ganze Dokument -----	1-8

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. November 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

20/11/1997

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Masturzo, P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04105

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9429336 A	22-12-94	AU 6986994 A	03-01-95
		BR 9406746 A	19-03-96
		CA 2162900 A	22-12-94
		CN 1127509 A	24-07-96
		CZ 9503020 A	17-04-96
		EP 0701568 A	20-03-96
		FI 955828 A	04-12-95
		HR 940311 A	31-10-96
		HU 74739 A	28-02-97
		JP 8511018 T	19-11-96
		LT 1947 A,B	27-12-94
		MX 9404114 A	31-01-95
		NO 954873 A	01-02-96
		NZ 267534 A	22-08-97
		PL 311819 A	18-03-96
		SK 145495 A	01-10-96
		US 5602253 A	11-02-97
WO 9625426 A	22-08-96	AU 4875196 A	04-09-96
		FI 973360 A	15-08-97